

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

AF

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07K 14/755, A61K 38/37</b>		<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/38219</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. September 1998 (03.09.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT98/00034		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CZ, HU, IL, JP, MX, NO, PL, RU, SI, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 18. Februar 1998 (18.02.98)			
(30) Prioritätsdaten: A 337/97 27. Februar 1997 (27.02.97) AT		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FISCHER, Bernhard [DE/AT]; Jägerhausgasse 14/11, A-1120 Wien (AT). SCHÖNBERGER, Öyvind, L. [DE/AT]; Schopenhauerstrasse 52/7, A-1180 Wien (AT). MITTERER, Artur [AT/AT]; A-2304 Mannsdorf 116 (AT). FIEDLER, Christian [AT/AT]; Haffnergasse 78/6/3, A-1220 Wien (AT). DÖRNER, Friedrich [AT/AT]; Peterlinigasse 17, A-1230 Wien (AT). EIBL, Johann [AT/AT]; Gustav-Tschermakgasse 2, A-1180 Wien (AT).			
(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).			
(54) Title: PURIFICATION OF VON WILLEBRAND FACTOR BY CATION EXCHANGER CHROMATOGRAPHY			
(54) Bezeichnung: REINIGUNG VON VON WILLEBRAND-FAKTOR DURCH KATIONENAUSTAUSCHERCHROMATOGRAPHIE			
(57) Abstract			
The invention relates to a method for obtaining vWF, whereby vWF is bonded to a cation exchanger at a low salt concentration and vWF with high specific activity is obtained by fractional elution. The invention also relates to a preparation with purified vWF which can be obtained by this method.			
(57) Zusammenfassung			
Beschrieben wird ein Verfahren zur Gewinnung von vWF, bei welchem vWF bei einer niedrigen Salzkonzentration an einen Kationenaustauscher gebunden wird und durch fraktionierte Elution vWF mit hoher spezifischer Aktivität gewonnen wird, sowie eine Präparation mit gereinigtem vWF, welche durch dieses Verfahren erhältlich ist.			

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Letland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Reinigung von von Willebrand-Faktor durch  
Kationenaustauscherchromatographie

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines gereinigten von Willebrand-Faktor-(vWF) mittels Kationenaustauscherchromatographie.

Im Plasma zirkuliert der vWF in einer Konzentration von 5 - 10 mg/l zum Teil in Form eines nicht-kovalenten Komplexes mit Faktor VIII. Der vWF ist ein Glycoprotein, welches in verschiedenen Zellen des menschlichen Körpers gebildet und später in die Zirkulation freigesetzt wird. Dabei wird in den Zellen ausgehend von einer Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 225000 Da (vWF-Monomer) durch Ausbildung von mehreren Schwefelbrücken ein vWF-Dimer (primäres vWF-Dimer) mit einem Molekulargewicht von ca. 450000 Da synthetisiert. Aus den vWF-Dimeren werden wiederum durch Verknüpfung über Schwefelbrücken weitere Polymere des vWF mit immer höheren Molekulargewichten, bis ca. 20000000 Da hergestellt.

Ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung des vWF ist die Multimer-Struktur-Analyse durch Agarose Elektrophorese. Es wird vermutet, daß insbesondere den hochmolekularen vWF-Polymeren essentielle Bedeutung bei der Blutgerinnung zukommt. Die funktionelle Aktivität des vWF wird üblicherweise durch die Ristocetin-Kofaktoraktivität (vWF:RistCoF) bestimmt. Als Merkmal für die Reinheit und spezifische Wirksamkeit des vWF wird das Verhältnis zwischen Aktivität und vWF-Antigenkonzentration (vWF:Ag) ermittelt. Die spezifische Aktivität eines Präparates nimmt mit zunehmendem vWF:RistCoF zu vWF:Ag-Verhältnis zu.

Der vWF erfüllt wichtige Funktionen im Rahmen der Hämostase. Er zirkuliert im Plasma zum Teil als Komplex mit Faktor VIII, der die Blutgerinnung als Cofaktor unterstützt. Faktor VIII wird durch die Komplexbildung mit vWF stabilisiert und vor proteolytischem Abbau geschützt. Eine weitere Aufgabe des vWF ist seine Beteiligung an der Thrombozytenaggregation, die einen wichtigen Beitrag zur primären Hämostase leistet. Dabei bindet der vWF an die Glycoproteine Ib und IIb/IIIa der Oberflächenrezeptoren der

Thrombozyten und vernetzt damit die Thrombozyten zu einem Thrombozyten-Aggregat. Weiterhin bedeutend für die primäre Hämostase ist die Affinität des vWF zu Collagen, einem Bestandteil der extrazellulären Matrix, die in intakten Gefäßen keinen direkten Kontakt mit dem Blut hat, da sie durch einen Monolayer aus Endothelzellen vom Blutstrom abgeschirmt ist. Bei Verletzung von Blutgefäßen kommt es aber am Ort der Läsion durch lokale Ablösung der Endothelzellschicht zu einer direkten Exposition der Bestandteile der extrazellulären Matrix mit dem Blut. Durch seine Affinität zum Collagen ist der vWF in der Lage, das sich bildende Thrombozyten-Aggregat im geschädigten Gefäßbereich am exponierten Subendothel zu fixieren. Dadurch erfolgt ein erster, labiler Wundverschluß, der durch die nachfolgende Blutgerinnung verfestigt wird.

Das von Willebrand-Syndrom ist durch einen Mangel eines funktionellen von Willebrand-Faktors oder durch ein abnormes Spektrum in der Multimerzusammensetzung des von Willebrand Faktors charakterisiert. Bei Patienten mit von Willebrand-Syndrom kann es, trotz der in der Regel normalen Syntheserate des Faktor VIII durch mangelnde Stabilisierung des Faktor VIII, zu einem Faktor VIII-Mangel kommen, der auf der stark verringerten Plasmahalbwertszeit dieses Gerinnungsfaktors beruht. Daher können Patienten mit von Willebrand-Syndrom ähnliche Symptome wie Hämophilie A-Patienten zeigen (phänotypische Hämophilie). Durch das Fehlen von funktionell aktivem vWF kann es bei Patienten mit von Willebrand-Syndrom auch zu Funktionsstörungen bei der Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion kommen, wodurch Defekte in der primären Hämostase auftreten können. Bedingt durch Störungen dieser vWF-vermittelten Vorgänge zeigen Patienten mit von Willebrand-Syndrom verlängerte Blutungszeiten.

Zur Behandlung des von Willebrand-Syndroms müssen daher vWF-Präparate verabreicht werden, die den Mangel an funktionell aktivem vWF ausgleichen. Dazu können Präparate eingesetzt werden, die auch zur Therapie der Hämophilie A verwendet werden, wie Kryopräzipitat oder daraus hergestellte Faktor VIII-Konzentrate, die Komplexe aus Faktor VIII und vWF enthalten. Allerdings werden zur Behandlung der Hämophilie A immer besser gereinigte Faktor

VIII:C-Konzentrate eingesetzt, die den vWF nicht oder nur noch in Spuren enthalten. Da die Supplementierung von Patienten mit von Willebrand-Syndrom mit Faktor VIII nicht notwendig ist und die Faktor VIII-Applikation die Gefahr einer Induktion von inhibitorischen Faktor VIII-Antikörpern im Patienten birgt, wäre ein vWF-Präparat, das möglichst weitgehend frei von kontaminierendem Faktor VIII ist, zur Behandlung des von Willebrand-Syndroms besonders wünschenswert. Daher besteht ein Bedarf an reinen und virussicheren von Willebrand Faktor-Präparationen mit hoher spezifischer Aktivität.

In der Literatur sind verschiedene Verfahren zur Reinigung und Gewinnung von vWF beschrieben.

Die EP 0 503 991 beschreibt die Reinigung von vWF aus humanem Kryopräzipitat durch drei aufeinanderfolgende chromatographische Schritte: 1. Anionenaustauscherchromatographie an TSK-DEAE- Fractogel und Elution des vWF durch 0,15 M NaCl; 2. Nochmalige Anionenaustauscherchromatographie an TSK-DEAE-Fractogel und Elution des vWF durch 0,17 M NaCl und 3. Affinitätschromatographie an Gelatin-Sepharose zur Abtrennung des kontaminierenden Fibrinogens. Dabei wurden Aminosäure- und Calciumionen-haltige Puffer verwendet.

Die WO 89/12065 beschreibt die Trennung von plasmatischem vWF von Faktor VIII und weiterer Proteine durch Bindung der Proteine an einen Anionenaustauscher und stufenweise Elution durch Erhöhung der Salzkonzentration. Die vWF-haltige Fraktion wurde ein zweites Mal über einen Anionenaustauscher chromatographiert und als Konzentrat gewonnen.

Die EP 0 469 985 offenbart die Reinigung von plasmatischem vWF aus Kryopräzipitat, wobei in einem ersten Schritt Faktor VIII selektiv bei einer Salzkonzentration von 250 mM an einen Anionenaustauscher gebunden wird, während vWF im Überstand verbleibt. Nach Erniedrigung der Salzkonzentration des vWF-haltigen Überstandes auf eine Salzkonzentration zwischen 100 mM und 150 mM wird vWF an einen zweiten Anionenaustauscher gebunden und bei pH 6,6 mit 300-350 mM NaCl eluiert. Dabei wird vWF mit einer Ak-

tivität von mindestens 50 U/mg, der einen Anteil von Faktor VIII von < 2% enthält, gewonnen.

Die DE 39 04 354 beschreibt die Gewinnung von plasmatischem vWF aus Kryopräzipitat und die Trennung von vWF vom Faktor VIII durch selektive Adsorption von Faktor VIII an einen Anionenaustauscher, während vWF in Lösung bleibt. Dabei wird eine Lösung enthaltend 160 U/ml vWF gewonnen.

Die US 5,006,642 beschreibt die Gewinnung von vWF aus einer gemäß der US 4,361,509 als Nebenprodukt anfallenden Lösung aus vWF und chaotropem Agens durch Dialyse gegen einen geeigneten Puffer oder ein Entsalzen der Lösung durch einen weiteren chromatographischen Schritt.

Die EP 0 383 234 beschreibt die Herstellung eines vWF-Konzentrates mittels Anionenaustauscherchromatographie, wobei ein in einer Lösung enthaltener Faktor VIII/vWF-Komplex durch Zugabe eines calcium- und aminosäurehaltigen Puffers dissoziiert und ein vWF-Konzentrat gewonnen wird.

Die WO 96/10584 beschreibt ein Verfahren zur Gewinnung von hochreinem rekombinatem vWF mittels kombinierter Anionenaustausch/Heparin-Affinitätschromatographie und die EP 0 705 846 die Trennung von hoch- und niedermolekularen Fraktionen von rekombinatem vWF mittels Heparin-Affinitätschromatographie.

Um eine gereinigte vWF-Präparation mit hoher spezifischer Aktivität zu gewinnen, war es bisher notwendig, mehrere chromatographische Schritte zu kombinieren. Insbesondere die Herstellung von Präparaten, die insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthielten, war bisher nur über eine Heparin-Affinitätschromatographie möglich. Heparin ist jedoch ein relativ kostspieliges Chromatographiematerial.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein für die großtechnische Anwendung im industriellen Maßstab geeignetes Verfahren zur Gewinnung von gereinigtem vWF mit verbesserter spezifischer Aktivität zur Verfügung zu stellen. Das Verfahren sollte sowohl für die Reinigung von rekombinatem als auch plasmatischem vWF

einsetzbar sein.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein Verfahren zur Gewinnung von vWF zur Verfügung gestellt wird, bei dem vWF bei einer niedrigen Salzkonzentration an einen Kationenaustauscher gebunden wird und durch stufenweise, fraktionierte Elution vWF, bestehend insbesondere aus hochmolekularen vWF-Multimeren mit hoher spezifischer Aktivität, gewonnen wird. Die Gewinnung und Anreicherung von vWF mit verbesserter Aktivität und Stabilität erfolgt insbesondere dadurch, daß durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration erst Fraktionen enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere, inaktive Abbauprodukte und unspezifische Begleitproteine bei einer mittleren Salzkonzentration abgetrennt werden und Fraktionen, enthaltend hochmolekulare vWF-Multimere mit hoher spezifischer Aktivität, bei einer höheren Salzkonzentration gewonnen werden.

vWF wird üblicherweise aufgrund seines sauren isoelektrischen Punktes (IEP  $\approx$  5,5 bis 6) und seiner daraus resultierenden negativen Netto-Ladung im schwach sauren bis basischen Milieu über positiv geladene Anionenaustauscher aufgereinigt. Es war daher aufgrund von den bisher beschriebenen Verfahren zur Reinigung von vWF mittels positiv geladener Anionenaustauscher nicht zu erwarten, daß vWF bei einem pH-Wert, der oberhalb des IEP des vWF liegt und niedriger Salzkonzentration an eine negativ geladene Gelmatrix eines Kationenaustauschers bindet und von dieser durch Erhöhung der Salzkonzentration selektiv eluierbar ist. Es war ebenfalls nicht zu erwarten, daß durch stufenweise Elution bei einer Salzkonzentration  $\geq$  300 mM vWF, bestehend insbesondere aus hochmolekularen vWF-Multimeren, erhalten wird.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ausgehend von einem unreinen biologischen Material gereinigte Fraktionen erhalten werden, die im wesentlichen frei von kontaminierenden Nukleinsäuren sind. Dadurch werden durch das Verfahren neben den unspezifischen Begleitproteinen auch Nukleinsäuren aus Proteinpräparationen entfernt. Dieser Effekt kann mit herkömmlichen Verfahren mittels Anionenaustauscher nicht gezeigt werden, da Nukleinsäuren auf-

grund ihrer negativen Ladung an den Anionenaustauscher binden, sich durch Erhöhung der Salzkonzentration wieder vom Anionenaustauscher ablösen und ins Eluat gelangen.

Bei der Reinigung des vWF ist insbesondere zu beachten, daß, bedingt durch die Größe des vWF von 500 000 bis mehrere Millionen, nur solche Trägermaterialien gute Reinigungen und Ausbeuten liefern, die das vWF-Molekül in der Diffusion und Verteilung in den verwendeten Trägermaterialien nicht behindern. Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahren zur Reinigung von vWF mit hoher spezifischer Aktivität mittels Kationenaustauscher wird nicht nur eine Gelmatrix verwendet, die eine hohe Beladungskapazität besitzt, robust in der Handhabung ist und ein scharfes Elutionsprofil zeigt, sondern die sich auch im industriellen Maßstab ökonomisch einsetzen läßt. Damit wird das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere für die Gewinnung von reinem vWF im großtechnischen Ansatz interessant.

Zur Durchführung des Verfahrens kann jeder bekannte Kationenaustauscher eingesetzt werden, wobei Kationenaustauscher mit einem Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen konjugierten Träger bevorzugt sind. Als gut geeignet haben sich zum Beispiel SP-Sepharose® Fast Flow und CM-Sepharose® Fast Flow (Pharmacia), Fractogel® EMD-SO3 und Fractogel® EMD COOH (Merck), Poros® 10 SP und Poros® 10 S (Perseptive Biosystems) und Toyopearl™ SP 550 C und Toyopearl™ CM-650 (M) (TosoHaas) erwiesen.

Als besonders günstig für die Gewinnung von gereinigtem vWF hat sich ein großporiges Gel mit Tentakelstruktur vom Typ Fractogel® EMD-SO3 und Fractogel® EMD COOH (Merck) erwiesen.

Die Adsorption des vWF an den Kationenaustauscher erfolgt vorzugsweise bei einer Salzkonzentration im Puffer von  $\leq 250$  mM. Bevorzugte Adsorptionpuffer weisen daher eine Salzkonzentration von 50 bis 250 mM, insbesondere im Bereich von 150 mM - 250 mM (z.B. 150 mM) auf. Durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration im Puffer kann selektiv vWF bestehend im wesentlichen aus hochmolekularen vWF-Multimeren bei einer Salzkonzentration von  $\geq 300$  mM eluiert werden. Niedermolekulare vWF-Multimere und



proteolytische vWF-Abbauprodukte, die in der vWF-haltigen Lösung enthalten sind und die eine geringe spezifische Aktivität in bezug auf die vWF-Aktivität, insbesondere auf die Ristocetin-Kofaktor-Aktivität, die Kollagenbindungsaktivität und die spezifische Plättchenagglutinationsaktivität aufweisen, werden bei einer Salzkonzentration zwischen  $\geq 250$  mM und  $\leq 300$  mM, vorzugsweise bei 300 mM vom Kationenaustauscher eluiert und abgetrennt.

Die Adsorption und Desorption des vWF kann in einem Puffer, enthaltend als Salz ein ein- oder zweiwertiges Metallion, erfolgen, wobei als Salz vorzugsweise NaCl verwendet wird.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird als Puffersystem zur Elution der an den Kationenaustauscher gebundenen Proteine vorzugsweise eine Pufferlösung bestehend aus Puffersubstanzen, insbesondere Glycin, Phosphatpuffer oder Citratpuffer, und Salz verwendet. Der eingesetzte Puffer enthält dabei vorzugsweise keine Calcium-Ionen.

Der Elutionspuffer kann einen pH-Wert im pH-Bereich zwischen 5,0 bis 8,5, vorzugsweise zwischen 6,0 und 8,0 aufweisen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann als Batch-Verfahren oder als Säulenchromatographie durchgeführt werden.

Die optimalen Parameter wie Salzkonzentration, pH-Wert und Temperatur zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind jedoch jeweils abhängig vom verwendeten Kationenaustauschermaterial. Es liegt jedoch im allgemeinen Wissen eines Fachmannes, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung offenbarten Bedingungen zur Durchführung des Verfahrens, für den jeweilig eingesetzten Kationenaustauschertyp zu optimieren.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird insbesondere ein vWF gewonnen und angereichert, der insbesondere aus hochmolekularen vWF-Multimeren besteht. Niedermolekulare vWF-Multimere und vWF-Fragmente mit geringer spezifischer Plättchenagglutinations-Aktivität werden selektiv abgetrennt, so daß Fraktionen enthaltend

insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere mit hoher Aktivität und Spezifität erhalten werden.

Die gewonnene(n) vWF-Fraktion(en) ist (sind) im wesentlichen frei von niedermolekularen vWF-Multimeren, vWF-Fragmenten mit geringer spezifischer Aktivität, Faktor VIII-Komplex, Faktor VIII:C, unspezifischen Begleitproteinen und kontaminierenden Nukleinsäuren.

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von gereinigtem vWF mittels dem erfindungsgemäßen Verfahren kann jede vWF-haltige Lösung eingesetzt werden. Ausgangsmaterialien sind insbesondere biologische Materialien wie Plasma, eine Plasmafraktion, Kryopräzipitat, oder ein Überstand oder ein Extrakt einer rekombinanten Zellkultur.

vWF-haltige Lösungen können jedoch auch angereicherte Proteinlösungen sein, die durch einen vorangegangenen Reinigungsschritt, etwa über Gelfiltration, Anionenaustauscherchromatographie, Affinitätschromatographie oder einer Kombination davon, vorgeeignet wurden. Durch diese vorgeschalteten Verfahren wird insbesondere erreicht, daß vWF angereichert und unspezifische Begleitproteine, insbesondere Faktor VIII oder Faktor VIII-Komplex, selektiv abgetrennt werden.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als Ausgangslösung eine über einen Anionenaustauscher angereicherte vWF-haltige Fraktion eingesetzt.

Mittels Anionenaustauscherchromatographie kann, abhängig von der Art der Durchführung der Anionenaustauscherchromatographie, vWF entweder als ungebundenes Material den Anionenaustauscher freipassieren oder an diesen adsorbieren. So wird vWF beispielsweise aus einer Plasmafraktion dadurch gewonnen und angereichert, daß sowohl vWF als auch Faktor VIII/vWF-Komplex bei geringer Ionenstärke und Salzkonzentration im schwach saurem Milieu an einen Anionenaustauscher binden. vWF wird vom Anionenaustauscher dann bei einer mittleren Salzkonzentration von 150 mM bis 250 mM selektiv eluiert, während Faktor VIII-Komplex und freier, nicht

komplexierter Faktor VIII erst bei einer hohen Salzkonzentration von > 300 mM desorbieren.

Eine angereicherte vWF-Fraktion kann auch dadurch erhalten werden, daß eine vWF-haltige Lösung bei einer mittleren Salzkonzentration zwischen 100 mM und 200 mM mit einem Anionenaustauscher behandelt wird, wobei Faktor VIII-Komplex an den Anionenaustauscher bindet, während vWF in Lösung bleibt. Gebundener Faktor VIII-Komplex kann anschließend vom Anionenaustauscher durch Erhöhung der Salzkonzentration gewonnen werden.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform wird der in einer angereicherten Lösung mit einer Salzkonzentration von  $\leq 250$  mM vorliegende vWF direkt aus dem Durchfluß oder Eluat bzw. als Überstand (beim Batch-Verfahren) gewonnen und gegebenenfalls, ohne Änderung der Ionenstärke oder Salzkonzentration an den Kationenaustauscher gebunden. Die Salzkonzentration kann jedoch, falls erforderlich, auch durch Verdünnung erniedrigt werden.

Diese Ausführungsform hat den besonderen Vorteil, daß eine einfache Kombination von Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie möglich ist, ohne aufwendige Umpufferung, Dialyse o.ä. der angereicherten Proteine.

Damit kann durch einen ersten Chromatographieschritt eine angereicherte vWF-haltige Fraktion erhalten werden und durch anschließende Kationenaustauscherchromatographie eine Reinigung und Trennung von hochmolekularen und niedermolekularen vWF-Fraktionen erreicht werden. Es sind jedoch auch andere Kombinationen, wie etwa Affinitäts-/Kationenaustauscherchromatographie, Anionenaustauscher-/Affinitäts-/Kationenaustauscherchromatographie möglich, um eine weitere Anreicherung und selektive Gewinnung von vWF mit hoher spezifischer Aktivität zu erreichen.

Mit dem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren wird vWF mit hoher spezifischer Aktivität aus einem unreinen vWF-haltigen Material mindestens 80fach angereichert.

Da prinzipiell jedes biologische Material mit infektiösen Keimen

kontaminiert sein kann, wird zur Herstellung eines virussicheren Präparates die gewonnene vWF-haltige Fraktion zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt. Dazu können alle aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren wie chemisch/physikalische Methoden, Inaktivierung durch Kombination einer photoaktiven Substanz und Licht oder Abreicherung durch Filtration eingesetzt werden. Zur Inaktivierung von Viren eignet sich insbesondere eine Hitzebehandlung in Lösung bzw. in festem Zustand, welche sowohl lipidumhüllte als auch nicht-lipidumhüllte Viren verlässlich inaktivieren kann. Die Virusabreicherung erfolgt vorzugsweise durch eine Filtration über Nanofilter.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Präparation, enthaltend gereinigten vWF mit hoher spezifischer Aktivität, bestehend insbesondere aus hochmolekularen vWF-Multimeren, erhältlich aus einer vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie, zur Verfügung. vWF mit hoher spezifischer Aktivität wird ausgehend von einem Ausgangsmaterial, enthaltend u.a. vWF mit geringer Reinheit und niedriger spezifischer Aktivität, angereichert und Begleitproteine, insbesondere Faktor VIII bzw. Faktor VIII-Komplex, enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere, selektiv abgetrennt. Dadurch wird insbesondere eine Präparation, enthaltend gereinigten vWF, der insbesondere aus hochmolekularen vWF-Multimere besteht und im wesentlichen keine niedermolekularen vWF-Multimere und vWF-Abbauprodukte enthält, gewonnen.

Die erfindungsgemäße Präparation weist insbesondere eine spezifische Plättchenagglutinations-Aktivität von vWF von mindestens 65 U/mg Protein und eine spezifische Collagen-Bindungsaktivität von mindestens 65 U/mg Protein auf. Ebenso zeichnet sich die Präparation dadurch aus, daß sie im wesentlichen frei ist von Faktor VIII und einen Faktor VIII-Gehalt von  $< 0,1\%$  in bezug auf das Verhältnis von Aktivität vWF zu Faktor VIII aufweist.

Ein weiteres Kriterium für die Reinheit und geringe Infektiosität eines Produktes ist auch die Abwesenheit von kontaminierenden Nukleinsäuren. Die erfindungsgemäße Präparation ist daher im wesentlichen frei von Nukleinsäuren. "Im wesentlichen" bedeutet

hier, daß der Gehalt an Nukleinsäure  $\leq 0,7$  bezogen auf das Verhältnis 260/280 nm ist. Die Nukleinsäure kann jedoch auch gemäß einem Verfahren, wie es beispielsweise in der EP 0 714 987 und der EP 0 714 988 beschrieben wird, quantifiziert werden.

Bei Gewinnung und Herstellung der erfindungsgemäßen Präparation mit plasmatischem vWF, aber auch mit rekombinantem vWF als Ausgangsmaterial wird, wie oben beschrieben, zur Entfernung von infektiösen Partikeln gegebenenfalls ein Virusabreicherungs/oder Inaktivierungsverfahren durchgeführt, wobei eine Virusinaktivierung und/oder Virusabreicherung prinzipiell vor oder nach jedem Reinigungsschritt ausgehend vom Ausgangsmaterial bis zur hergestellten pharmazeutischen Zubereitung erfolgen kann. Damit ist die erfindungsgemäße Präparation in jedem Fall virussicher.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform liegt die erfindungsgemäße Präparation in einer lagerstabilen Form vor. Die Präparation, enthaltend gereinigten vWF mit hoher spezifischer Aktivität, kann als fertige Lösung, Lyophilisat oder tiefgefroren bereitgestellt werden. Aufgrund ihrer Reinheit ist die Präparation besonders stabil. So hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäße Präparation bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für mindestens 6 Monate, bei  $4^{\circ}\text{C}$  in Lösung für mindestens 4 Wochen und als Lyophilisat für mindestens 1 Jahr stabil ist. Es zeigte sich, daß innerhalb des jeweiligen Zeitraumes die vWF-Aktivität um maximal 10% reduziert wird und auch das Multimermuster der vWF-Multimere keine wesentliche Änderung zeigt.

Die Formulierung der erfindungsgemäßen Präparation kann in an sich bekannter und üblicher Weise erfolgen. Der gereinigte vWF, enthalten in der erfindungsgemäßen Präparation, wird mit einem Puffer enthaltend Salze, wie NaCl, Trinatrium-citratdihydrat und/oder  $\text{CaCl}_2$ , und Aminosäuren, wie Glycin und Lysin, bei einem pH im Bereich von 6 bis 8 gemischt und als pharmazeutisches Präparat formuliert.

Die Präparation kann zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Patienten mit phänotypischer Hämophilie und vWD verwendet werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und der Zeichnungsfiguren näher erläutert, wobei sie jedoch nicht auf diese Ausführungsbeispiele beschränkt ist.

Es zeigen:

- Figur 1: Multimer-Analyse von rvWF vor und nach Reinigung mittels Kationenaustauscherchromatographie
- Figur 2: Multimer-Analyse von vWF aus Kryopräzipitat vor und nach Reinigung mittels kombinierter Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie unter Bedingungen, unter denen vWF an den Anionenaustauscher bindet (Beispiel 2 A)
- Figur 3: Multimer-Analyse von vWF aus Kryopräzipitat vor und nach Reinigung mittels kombinierter Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie unter Bedingungen, unter denen vWF nicht an den Anionenaustauscher bindet (Beispiel 2 B)

Beispiel 1 beschreibt die Reinigung von rvWF aus Kulturüberständen rekombinanter Zellen mittels Kationenaustauscherchromatographie; Beispiel 2 beschreibt die Reinigung von plasmatischem vWF mittels Kationenaustauscherchromatographie und vorgeschaltener Anionenaustauscherchromatographie; Beispiel 3 beschreibt die Reinigung von rekombinantem vWF mittels kombinierter Anionenaustauscher-/Immunaффinitäts- und Kationenaustauscher-Chromatographie.

#### **Beispiel 1:**

**Reinigung von vWF aus Kulturüberständen rekombinanter Zellen mittels Kationenaustauscherchromatographie**

vWF wurde in rekombinanten CHO-Zellen in einem üblichen Kultur-

medium produziert. Nach der Fermentation der transformierten Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen und Zellen und Zellbruchstücke durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde die Lösung zur Entfernung von niedermolekularen Bestandteilen, wie Membranbruchstücke, durch Filter mit Porengröße von 0,4  $\mu$ m geklärt.

Eine Chromatographiesäule (50 ml) wurde mit einem Kationenaustauscher (Fractogel® EMD-S03) gefüllt und mit Puffer (30 mM Glycin-NaCl-Puffer) gespült. Anschließend wurde die Kationenaustauschersäule mit dem zellfreien Kulturüberstand beladen, wobei solche Proteine, die nicht an den Austauscher binden, im Durchfluß erhalten wurden (Fraktion 1). Gebundene unspezifische Begleitproteine wurden durch Spülen der Säule mit Puffer, enthaltend 0,3 M NaCl, entfernt (Fraktion 2). Anschließend wurde gebundener vWF vom Austauscher mit Puffer, enthaltend 0,5 M NaCl, desorbiert und im Eluat erhalten (Fraktion 3).

Alle Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt, vWF-Antigengehalt (vWF:Ag), vWF-Aktivität (Ristocetin-Kofaktor-Aktivität, vWF:RistCoF), untersucht und einer vWF-Multimer-Analyse unterzogen. Die Proteinkonzentration wurde mittels der Bradford-Methode (M. Bradford (1976), Anal. Biochem., 72: 248-254) bestimmt. Der Gehalt an vWF wurde mittels eines handelsüblichen ELISA-Systems (ASSERACHROM®vWF, Boehringer Mannheim) bestimmt. Die Ristocetin-CoFaktor-Aktivität wurde mittels eines üblichen Testsystems (v-Willebrand-Reagenz®, Behringwerke) ermittelt. Die Ergebnisse der Kationenaustauscherchromatographie sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt. Fig. 1 zeigt die vWF-Multimer-Analyse vor und nach Reinigung über den Kationenaustauscher.

Aus der Tabelle 1 ist ersichtlich, daß der gesamte im Ausgangsmaterial vorhandene vWF mit Ristocetin-CoFaktor-Aktivität durch den Kationenaustauscher gebunden wird. Durch Spülen der Kationenaustauschersäule mit einem Puffer, enthaltend 0,3 M NaCl (Fraktion 2), wird vWF ohne meßbare Aktivität entfernt. Durch Elution mit 0,5 M NaCl (Fraktion 3) wird vWF mit nahezu aller Ristocetin-CoFaktor-Aktivität erhalten. Außerdem wird eine hohe Anreicherung von DNA des Kulturüberstandes erhalten: das Absorp-

tionsverhältnis 260 nm / 280 nm fällt von 1,2 auf 0,7. Mit diesem einen chromatographischen Schritt ergibt sich ein Reinigungsfaktor von 10.

Figur 1 zeigt die Multimer-Analyse von vWF vor und nach Reinigung mittels Kationenaustauscherchromatographie. In Fig. 1, Spur A, ist ungereinigter rvWF, in Spur B vWF-Multimere der Fraktion 1 im Durchlauf; in Spur C vWF-Multimere der Fraktion 2 (0,3 M NaCl-Eluat) und in Spur D die der Fraktion 3 (0,5 M NaCl-Eluat) gezeigt. Aus Figur 1 ist ersichtlich, daß durch die Kationenaustauscherchromatographie und selektive Elution ein vWF, enthaltend insbesondere hochmolekulare Multimerstrukturen erhalten wird. Niedermolekulare vWF-Multimere bzw. vWF-Abbauprodukte werden entweder nicht an den Kationen-Austauscher gebunden (Fraktion 1) oder durch Elution mit 0,3 M NaCl selektiv abgetrennt (Fraktion 2).

**Tabelle 1** Reinigung von rekombinantem vWF (rvWF) mittels Kationenaustauscherchromatographie

Probe	vWF:RistCoF (U/ml)	vWF:Ag (µg/ml)	UV-Absorptions- verhältnis 260 nm / 280 nm
Ungereinigter vWF	0,338	120,36	1,2
Fraktion 1 (nicht gebunden)	0	2,8	1,5
Fraktion 2 (Eluat 0,3 M NaCl)	0	10,7	0,7
Fraktion 3 (Eluat 0,5 M NaCl)	0,450	48,9	0,7

#### Beispiel 2 :

Reinigung von plasmatischem vWF über Kation austauscher mit vorgeschaltener Reinigung über Anionenaustausch r

A. Anionenaustauscherchromatographie unter Bedingungen, unter



den n vWF an den Anionenaustauscher bindet und selektive Elution von vWF

Kryopräzipitat aus humanem Plasma wurde in einem Puffer aus 7 mM Tris, 100 mM Na-Acetat, 100 mM Lysin bei pH 6,7 aufgelöst. Zur Vorbehandlung wurde Al(OH)<sub>3</sub> eingerührt. Anschließend wurde der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt.

Auf diese Weise vorbehandeltes Kryopräzipitat wurde auf eine Anionenaustauschersäule Fractogel® EMD-TMAE aufgetragen. Schwach gebundene Proteine wurde durch Spülen der Säule mit einem 160 mM NaCl-haltigen Puffer entfernt. Durch Elution mit 250 mM NaCl im Puffer wurde vorrangig vWF vom Austauscher eluiert (Fraktion 1). Durch Elution mit 400 mM NaCl wurde anschließend FVIII-Komplex eluiert (Fraktion 2). Ausgehend vom Kryopräzipitat enthielt die Fraktion 1 68% der gesamten vWF-Aktivität, jedoch nur 10 % der gesamten FVIII-Aktivität. Restliche vWF-Aktivität und 80 % der FVIII-Aktivität sind in der Fraktion 2 enthalten.

**Tabelle 2** Anreicherung von vWF mittels Anionenaustauscher-chromatographie

Probe	vWF:Rist CoF-Aktivität (U/ml)	FVIII:C Aktivität (U/ml)
Kryopräzipitat	13,5	13,6
Fraktion 1 (Eluat 250 mM NaCl)	5,4	2,8
Fraktion 2 (Eluat 400 mM NaCl)	4,5	11,8

Die vWF-haltige Fraktion 1 wurde anschließend auf eine Kationenaustauschersäule Fractogel® EMD-SO<sub>3</sub> aufgetragen. Schwach gebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit 100 mM NaCl entfernt. Anschließend wurde stufenweise mit 200 mM NaCl (Fraktion 1), 300 mM NaCl (Fraktion 2) und 400 mM NaCl (Fraktion 3) eluiert. Über 70 % der gesamten vWF-Aktivität wurde in der 400 mM

NaCl-Fraktion gefunden. Es wurde keine FVIII:C-Aktivität gefunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

**Tabelle 3** Stufenweise Elution von vWF-Fraktionen vom Kationenaustauscher

Probe	vWF:Rist -CoF-Aktivität (U/ml)
vWF Fraktion 1 (Tab.2)	5,4
Fraktion 1 (Eluat 200 mM NaCl)	0
Fraktion 2 (Eluat 300 mM NaCl)	0,2
Fraktion 3 (Eluat 400 mM NaCl)	3,75

Während die spezifische Aktivität des vWF im Kryopräzipitat 0,6 U/mg Protein betrug, beträgt diese im 400 mM NaCl-Eluat nach Kationenaustauscherchromatographie 65 U/ml. Die spezifische Collagen-Bindungsaktivität stieg von 0,7 U/mg Protein im Kryopräzipitat auf 65 U/mg Protein im 400 mM NaCl-Eluat nach Kationenaustauscherchromatographie. Ausgehend von Kryopräzipitat wurde die Reinheit des vWF 100-fach erhöht.

Figur 2 zeigt die vWF-Multimer-Analyse während der kombinierten Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie. Die Spuren A bis E zeigen dabei die Reinigung über Anionenaustauscher und die Spuren F bis K die über Kationenaustauscher. Es zeigen Fig. 2, Spur A das vWF-Multimermuster von vWF im Kryopräzipitat, Spur B nach Filtration, Spur C im Durchlauf, Spur D das 250 mM NaCl-Eluat (Fraktion 1, Tabelle 2), Spur E das 400 mM NaCl-Eluat (Fraktion 2, Tabelle 2), Spur F das 250 mM NaCl-Eluat (Fraktion 1, Tabelle 2) vor der Kationenaustauscherchromatographie, Spur G den Durchlauf, Spur H das 200 mM NaCl-Eluat (Fraktion 1, Tabelle 3), Spur I das 300 mM NaCl-Eluat (Fraktion 2, Tabelle 3) und Spur K das 400 mM NaCl-Eluat (Fraktion 3, Tabelle 3). Aus Spur H und I ist erkennbar, daß durch Elution mit 200 mM NaCl bzw. 300 mM NaCl nur niedermolekulare vWF-Multimere vom Kationenaustauscher abge-

löst werden. Elution des Kationenaustauschers mit 400 mM NaCl, Spur K, ergab vWF enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere.

**B. Anionenaustauscherchromatographie unter Bedingungen, unter denen vWF nicht an den Anionenaustauscher bindet und in Lösung verbleibt**

Kryopräzipitat aus humanem Plasma wurde in einem Puffer aus 7 mM Tris, 100 mM Na-Acetat, 100 mM Lysin, 120 mM NaCl bei pH 6,7 aufgelöst. Zur Vorbehandlung wurde Al(OH)<sub>3</sub> eingerührt. Anschließend wurde der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt.

Auf diese Weise vorbehandeltes Kryopräzipitat wurde auf eine Säule Fractogel® EMD-TMAE aufgetragen. Nicht gebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit Lösungspuffer erhalten (Fraktion 1). Diese Fraktion 1 enthielt 60 % der vWF-Aktivität und nur 10 % der FVIII-Aktivität. Durch Elution der Säule mit 400 mM NaCl (Fraktion 2) wurde anschließend FVIII-Komplex erhalten.

**Tabelle 4** Anreicherung von vWF mittels Anionenaustauscherchromatographie

Probe	vWF:Rist CoF-Aktivität (U/ml)	FVIII:C Aktivität (U/ml)
Kryopräzipitat	12,5	12,2
Fraktion 1 (vWF nicht gebunden)	3,5	0,7
Fraktion 2 Eluat 400 mM NaCl	2,5	14,5

Die vWF-haltige Fraktion 1 wurde anschließend auf eine Kationenaustauschersäule (Fractogel® EMD-SO3) aufgetragen. Schwach gebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit 100 mM NaCl entfernt. Anschließend wurde stufenweise mit 200 mM NaCl (Fraktion 1), 300 mM NaCl (Fraktion 2) und 400 mM NaCl (Fraktion 3)

eluiert. Über 70 % der vWF-Aktivität wurden in der 400 mM NaCl-Fraktion gefunden. Es wurde kein Faktor VIII-Antigen und FVIII:C-Aktivität gefunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

**Tabelle 5** Stufenweise Elution von vWF-Fraktionen vom Kationenaustauscher

Probe	vWF:Rist CoF-Aktivität (U/ml)
vWF (Fraktion 1, Tab. 4)	3,5
Fraktion 1 (Eluat 200 mM NaCl)	0
Fraktion 2 (Eluat 300 mM NaCl)	0,2
Fraktion 3 (Eluat 400 mM NaCl)	3,75

Während die spezifische Aktivität des vWF im Kryopräzipitat 0,6 U/mg Protein betrug, beträgt diese im 400 mM NaCl-Eluat nach Kationenaustauscherchromatographie 47 U/mg. Die spezifische Collagen-Bindungsaktivität stieg von 0,7 U/mg Protein im Kryopräzipitat auf 51 U/mg Protein im 400 mM NaCl-Eluat nach Kationenaustauscherchromatographie. Ausgehend von Kryopräzipitat wurde die Reinheit des vWF 80-fach erhöht.

Figur 3 zeigt die vWF-Multimer-Analyse während der kombinierten Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie. Die Spuren a bis c zeigen dabei Reinigung über Anionenaustauscher und die Spuren d bis h die über Kationenaustauscher. Es zeigen Fig. 3, Spur a das vWF-Multimermuster von vWF im Kryopräzipitat, Spur b im Durchlauf, Spur c das 400 mM NaCl-Eluat (Fraktion 2, Tabelle 4), Spur d den Durchlauf (Fraktion 1, Tabelle 4) vor der Kationenaustauscherchromatographie, Spur e den Durchlauf über Kationenaustauscher, Spur f das 200 mM NaCl-Eluat (Fraktion 1, Tabelle 5), Spur g das 300 mM NaCl-Eluat (Fraktion 2, Tabelle 5) und Spur h

das 400 mM NaCl-Eluat (Fraktion 3, Tabelle 5). Die vWF-Multimerstruktur des vWF in den Fraktionen, die mit 200 mM NaCl (Spur f) bzw. 300 mM NaCl (Spur g), sowie 400 mM NaCl (Spur h) nach Kationenaustauscherchromatographie erhalten wurden, ist entsprechend dargestellt. Das 400 mM NaCl-Eluat (Spur h) zeigt ein hochmolekulares vWF-Multimermuster und enthält mehr als 70% der vWF-Aktivität (derzeit nach Ansicht der Anmelderin der beste Weg zur Ausführung der Erfindung).

### **B e i s p i e l 3 :**

**Reinigung von rekombinantem vWF mittels kombinierter Anionenaustauscher-/Immunaффinitäts- und Kationenaustauscherchromatographie**

vWF wurde durch rekombinante CHO-Zellen in einem üblichen Kulturmedium produziert. Nach der Fermentation der transformierten Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, Zellen und Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde die Lösung zur Entfernung von niedermolekularen Bestandteilen, wie Membranbruchstücke, durch Filter mit Porengröße von 0,4 µm filtriert.

### **Anionenaustauscher-Chromatographie**

1000 ml zellfreier Kulturüberstand wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,7 cm/min über eine Säule (7,1 cm<sup>2</sup> x 8 cm, gefüllt mit 57 ml Anionenaustauscher Fractogel® EMD-TMAE 650 M (Merck)) filtriert. Das Gel wurde zuvor mit 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) äquilibriert. Anschließend wurde die Säule mit 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0), der 0,1 M NaCl enthielt, gewaschen. Begleitstoffe und vWF mit geringer RistCoF-Aktivität wurden durch Waschen der Säule mit 200 mM NaCl enthaltendem Puffer entfernt. Der rvWF wurde dann mit 280 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) vom Träger eluiert.

### **Immunaффinitätschromatographie**

Das 280 mM NaCl-Eluat des Anionenaustauscherschrittes wurde auf ein immobilisiertes Antikörperharz (Säulendimension: 19,6 cm<sup>2</sup> x 5,6 cm; Gelbettvolumen: 110 ml; Harzmatrix: Sepharose CL2B; Antikörper: Fab-Fragmente des murinen monoklonalen Antikörpers

AvW8/2), das mit 20 mM Na-Acetat, 300 mM NaCl, (pH 7,0) äquili-  
briert worden war, mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,255  
cm/min geladen. Anschließend wurde mit 20 mM Na-Acetat, 300 mM  
NaCl (pH 7,0), dem 0,5% Tween 80 zugesetzt waren, gespült. r-vWF  
wurde mit 20 mM Glycin-Puffer, dem 10% Saccharose zugesetzt wor-  
den war, bei pH 8,0 eluiert. Nach 80% des Säulenvolumens wurde  
die Fließgeschwindigkeit um das rund 20-fache reduziert.

#### **Kationenaustauscher-Chromatographie**

Eine Chromatographiesäule (7,1 cm<sup>2</sup> x 8 cm, gefüllt mit 57 ml  
Fractogel® EMD-SO3) wurde mit Puffer (30 mM Glycin-NaCl-Puffer;  
pH 5,0) gespült. Anschließend wurde das Eluat der Immunaaffini-  
tätschromatographie durch die Kationenaustauschersäule fil-  
triert. Nach erneutem Waschen der Säule mit 30 mM Glycin-NaCl-  
Puffer wurden an den Kationenaustauscher gebundene Begleitstoffe  
und vWF mit geringer spezifischer Aktivität durch Spülen der  
Säule mit gepufferter 0,3 M NaCl-Lösung entfernt. Anschließend  
wurde vWF von der Austauschersäule durch Elution mit Puffer,  
enthaltend 0,5 M NaCl, in der Fraktion 3 erhalten.

Nach den einzelnen Chromatographie-Schritten wurde die Protein-  
konzentration, der Gehalt an rvWF-Antigen (vWF:Ag) und die  
Ristocetin-Kofaktor-Aktivität (vWF:RistCoF) ermittelt.

Es wurde gefunden, daß rvWF durch die Anionenaustauscherchroma-  
tographie um den Faktor 2,3 angereichert wird. In der darauffol-  
genden Immunaaffinitätschromatographie erfolgte eine weitere An-  
reicherung um den Faktor 3,6. Durch die daran anschließende Kat-  
ionenaustauscherchromatographie konnte der vWF nochmals um einen  
Faktor 5,2 angereichert werden. Außerdem konnten durch diesen  
Schritt die im Eluat der Immunaaffinitätssäule vorhandenen Spuren  
an murinem Antikörper praktisch vollständig entfernt werden  
( $<0,02$  mg/1000 U vWF RistCoF-Aktivität). Durch anschließende  
Kationenaustauscherchromatographie erfolgte eine Abtrennung der  
niedermolekularen vWF-Multimere und Anreicherung von vWF mit  
hochmolekularen Multimerstrukturen, wodurch das Verhältnis von  
vWF:RistCoF- zu vWF:Ag-Aktivität um den Faktor 4 gesteigert  
wird.

Die Ergebnisse der Reinigung des rvWF in den unterschiedlichen Stufen dieses sequenziellen Reinigungsverfahrens sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6** Reinigung von rekombinantem vWF mittels kombinierter Anionenaustauscher- /Immunaffinitäts- und Kationenaustauscher-Chromatographie

Probe	Protein (mg/ml)	vWF:RistCoF (U/ml)	vWF:Ag (mg/ml)	vWF:RistCoF/Protein (U/mg)
Ungereinigter vWF	0,626	1,013	0,116	1,62
Eluat Anionenaustauscher	0,684	2,588	0,322	3,78
Eluat Immunaffinität	0,198	2,700	0,348	13,64
Eluat Kationenaustauscher	0,046	2,250	0,074	59,20

### P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verfahren zur Gewinnung von vWF, dadurch gekennzeichnet, daß vWF bei einer niedrigen Salzkonzentration an einen Kationenaustauscher gebunden wird und durch fraktionierte Elution vWF mit hoher spezifischer Aktivität gewonnen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß vWF bei einer Salzkonzentration von  $\leq 250$  mM an den Kationenaustauscher gebunden wird und vWF-Fractionen, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, bei einer Salzkonzentration von  $\geq 300$  mM eluiert werden.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß vWF-haltige Fractionen, enthaltend hochmolekulare vWF-Multimere, in einem Puffer mit einem pH-Wert im Bereich zwischen 5,0 bis 8,5, vorzugsweise zwischen 6,0 und 8,0, eluiert werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß niedermolekulare vWF-Multimere, proteolytische vWF-Abbauprodukte mit geringer spezifischer Aktivität und unspezifische Begleitproteine bei einer Salzkonzentration zwischen  $\geq 250$  mM und  $\leq 300$  mM, entfernt werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Kationenaustauscher ein Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen konjugierter Träger ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß vWF-haltige Fraktion(en), enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, mit einer spezifischen Plättchenagglutinations-Aktivität von mindestens 65 U/mg Protein und einer spezifischen Collagen-Bindungsaktivität von mindestens 65 U/mg Protein gewonnen werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die gewonnene(n) vWF-haltige Fraktion(en) im we-



sentlichen frei ist (sind) von niedermolekularen vWF-Multimeren, vWF-Fragmenten mit geringer spezifischer vWF-Aktivität und kontaminierenden Nukleinsäuren.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß vWF mit hoher spezifischer Aktivität aus Plasma, einer Plasmafraktion, Kryopräzipitat, dem Überstand oder Extrakt einer rekombinanten Zellkultur, oder einer angereicherten Proteinlösung gewonnen wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die angereicherte Proteinlösung durch einen vorangegangenen Reinigungsschritt erhalten wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die angereicherte Proteinlösung durch ein chromatographisches Verfahren, wie Anionenaustauscher- oder Affinitätschromatographie oder einer Kombination davon erhalten wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die gewonnene(n) vWF-haltige(n) Fraktion(en) zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt wird (werden).

12. Präparation enthaltend gereinigten vWF, bestehend insbesondere aus hochmolekularen vWF-Multimeren, erhältlich aus einer vWF-haltigen Proteinlösung durch Kationenaustauscherchromatographie.

13. Präparation nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie im wesentlichen keine niedermolekularen vWF-Multimere, inaktive vWF-Abbauprodukte und kontaminierende Nukleinsäuren enthält.

14. Präparation nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie vWF mit einer spezifischen Plättchenagglutinationsaktivität von mindestens 65 U/mg Protein und einer spezifischen Collagen-Bindungsaktivität von mindestens 65 U/mg Protein enthält.

15. Präparation nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie im wesentlichen frei ist von Faktor VIII und einen Faktor VIII-Gehalt von  $< 0,1\%$  in bezug auf das Verhältnis von Aktivität vWF zu Faktor VIII:C aufweist.

16. Präparation nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie virussicher ist.

17. Präparation nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer lagerstabilen Form vorliegt.

18. Präparation nach einem der Ansprüche 12 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß sie als pharmazeutisches Präparat formuliert ist.

19. Verwendung einer vWF-haltigen Präparation nach einem der Ansprüche 12 bis 18 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Patienten mit phänotypischer Hämophilie und vWD.

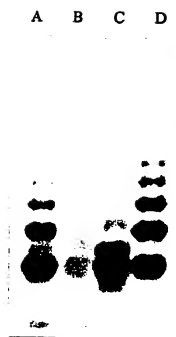


FIG. 1

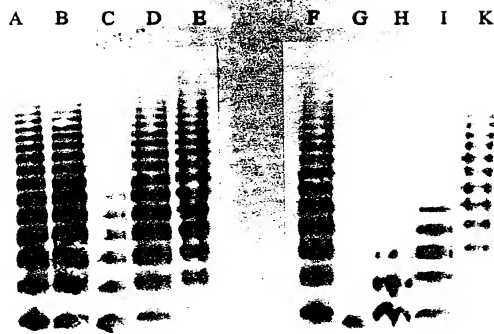


FIG. 2

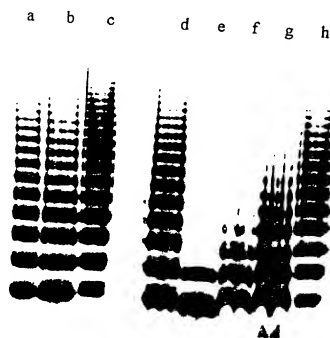


FIG. 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/AT 98/00034

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07K14/755 A61K38/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 705 846 A (IMMUNO AG) 10 April 1996 see claims; examples ---	1, 12, 13, 19
X	WO 93 15199 A (RHONE-POULENC RORER SA) 5 August 1993 see claims; example 7 ---	1, 12, 19
X	EP 0 469 985 A (AQUITAINE DEV TRANSF SANGUINE) 5 February 1992 see claims; examples ---	1, 12, 19
X	WO 91 13093 A (BIO TECHNOLOGY GENERAL CORP) 5 September 1991 see claims; example 4 ---	1, 12, 19

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 1998

Date of mailing of the international search report

03/07/1998

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentamt  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT 98/00034

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	EP 0 600 480 A (SCLAVO SPA ;AIMA DERIVATI SPA (IT)) 8 June 1994 see claims; example -----	1,19

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/AT 98/00034

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 0705846	A	10-04-1996		DE 4435392 A	11-04-1996
				CA 2159702 A	05-04-1996
				JP 8119997 A	14-05-1996
-----					
WO 9315199	A	05-08-1993		FR 2686899 A	06-08-1993
				EP 0624195 A	17-11-1994
				FI 943563 A	29-07-1994
				JP 7503368 T	13-04-1995
-----					
EP 0469985	A	05-02-1992		FR 2665449 A	07-02-1992
				AT 152128 T	15-05-1997
				DE 69125764 D	28-05-1997
				DE 69125764 T	13-11-1997
				DK 469985 T	20-10-1997
				ES 2038095 T	16-09-1997
				JP 2559645 B	04-12-1996
				JP 4234400 A	24-08-1992
				US 5760183 A	02-06-1998
				US 5252710 A	12-10-1993
-----					
WO 9113093	A	05-09-1991		AU 645077 B	06-01-1994
				AU 7496491 A	18-09-1991
				CA 2077446 A	03-09-1991
				EP 0517826 A	16-12-1992
				FI 923935 A	02-09-1992
-----					
EP 0600480	A	08-06-1994		IT 1256622 B	12-12-1995
-----					

Form PCT/ISA(210) (patent family annex) (July 1992)



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/AT 98/00034

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C07K14/755 A61K38/37

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindeststoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C07K A61K

Recherchierte oder nicht zum Mindeststoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 705 846 A (IMMUNO AG) 10. April 1996 siehe Ansprüche; Beispiele ---	1. 12. 13. 19
X	WO 93 15199 A (RHONE-POULENC RORER SA) 5. August 1993 siehe Ansprüche; Beispiel 7 ---	1. 12. 19
X	EP 0 469 985 A (AQUITAINE DEV TRANSF SANGUINE) 5. Februar 1992 siehe Ansprüche; Beispiele ---	1. 12. 19
X	WO 91 13093 A (BIO TECHNOLOGY GENERAL CORP) 5. September 1991 siehe Ansprüche; Beispiel 4 ---	1. 12. 19

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Juni 1998

Absenddatum des internationalen Rechercheberichts

03/07/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchebehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax. (+31-70) 340-3015

Bevollmächtigter Beauftragter

Fuhr, C

Formblatt PCT/ISA(210) (Erat 2) (Juli 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/AT 98/00034

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	EP 0 600 480 A (SCLAVO SPA ;AIMA DERIVATI SPA (IT)) 8.Juni 1994 siehe Ansprüche; Beispiel -----	1,19

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 98/00034

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0705846 A	10-04-1996	DE 4435392 A	11-04-1996
		CA 2159702 A	05-04-1996
		JP 8119997 A	14-05-1996
WO 9315199 A	05-08-1993	FR 2686899 A	06-08-1993
		EP 0624195 A	17-11-1994
		FI 943563 A	29-07-1994
		JP 7503368 T	13-04-1995
EP 0469985 A	05-02-1992	FR 2665449 A	07-02-1992
		AT 152128 T	15-05-1997
		DE 69125764 D	28-05-1997
		DE 69125764 T	13-11-1997
		DK 469985 T	20-10-1997
		ES 2038095 T	16-09-1997
		JP 2559645 B	04-12-1996
		JP 4234400 A	24-08-1992
		US 5760183 A	02-06-1998
		US 5252710 A	12-10-1993
WO 9113093 A	05-09-1991	AU 645077 B	06-01-1994
		AU 7496491 A	18-09-1991
		CA 2077446 A	03-09-1991
		EP 0517826 A	16-12-1992
		FI 923935 A	02-09-1992
EP 0600480 A	08-06-1994	IT 1256622 B	12-12-1995

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie JULI 1992)

